

09/763625

JC02 Rec'd PCT/PTO 06 MAR 2001

P20718.P03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant :Y. AIDA

Serial No. : Not Yet Assigned

PCT Branch

Filed :September 7, 1999

PCT/JP99/04834

For :ANTIBODY FOR DETECTING POSSIBILITY OF ONSET OF BOVINE LEUKEMIA

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner of Patents and Trademarks

Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 10/252128, filed September 7, 1998. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
Y. AIDA

Leslie J. Bernstein Reg. No.
Bruce H. Bernstein 33,329
Reg. No. 29,027

March 6, 2001
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 1999年09月07日 (07.09.1999) 火曜日 13時09分09秒

99300M

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	この特許協力条約に基づく国際出願願書(様式 - PCT/R0/101)は、右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.07.1999)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	99300M
I	発明の名称	ウシ白血病発症可能性の判定用抗体
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	
II-4ja	名称	理化学研究所
II-4en	Name	RIKEN
II-5ja	あて名:	351-0198 日本国 埼玉県 和光市 広沢 2 番 1 号
II-5en	Address:	2-1, Hirosawa Wako-shi, Saitama 351-0198 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4ja	氏名(姓名)	間 陽子
III-1-4en	Name (LAST, First)	AIDA, Yoko
III-1-5ja	あて名:	305-0074 日本国 茨城県 つくば市 高野台 3 丁目 1 番地の 1 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター内
III-1-5en	Address:	c/o RIKEN, TSUKUBA LIFE SCIENCE CENTER, 1-1, Koyadai 3-chome Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0074 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

99300M




原本(出願用) - 印刷日時 1999年09月07日 (07.09.1999) 火曜日 13時09分09秒

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	今村 正純 IMAMURA, Masazumi 104-0031 日本国 東京都 中央区 京橋1丁目5番5号 KRFビル5階
IV-1-2en	Address:	5th Floor, KRF Bldg., 5-5, Kyobashi 1-chome Chuo-ku, Tokyo 104-0031 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3271-1331
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3271-1410
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja IV-2-1en	氏名 Name(s)	塩澤 寿夫; 釜田 淳爾 SHIOZAWA, Hisao; KAMATA, Junji
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ UG ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	先の出願日	1998年09月07日 (07.09.1998)
VI-1-2	先の出願番号	特願平10-252128
VI-1-3	国名	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

99300M

原本(出願用) - 印刷日時 1999年09月07日 (07.09.1999) 火曜日 13時09分09秒

VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書	9	-
VIII-3	請求の範囲	1	-
VIII-4	要約	1	99300m.txt
VIII-5	図面	0	-
VIII-7	合計	15	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状		-
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込みを証明する書面	-
VIII-17	その他	優先権書類送付請求書	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	今村 正純	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	塩澤 寿夫	
IX-3	提出者の記名押印		
IX-3-1	氏名(姓名)	釜田 淳爾	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

99300M

原本（出願用） - 印刷日時 1999年09月07日（07.09.1999）火曜日 13時09分09秒

10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	
------	----------------------------------	--

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

特許協力条約に基づく国際出願願書(願書付属書－
手数料計算用紙)

99300M

原本(出願用) - 印刷日時 1999年09月07日 (07.09.1999) 火曜日 13時09分09秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄			
0-1	国際出願番号			
0-2	受理官庁の日付印			
0-4	(付属書) この特許協力条約に基づく国際 出願願書付属書(様式 - PCT/RO/101(Annex))は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.07.1999)		
0-9	出願人又は代理人の書類記号	99300M		
2	出願人	理化学研究所		
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)	
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000	
12-2	調査手数料 S	⇒	77,000	
12-3	国際手数料 基本手数料 (最初の30枚まで) b1	54,800		
12-4	30枚を越える用紙の枚数	0		
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,300		
12-6	合計の手数料 b2	0		
12-7	b1 + b2 = B	54,800		
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国 数	79		
12-9	支払うべき指定手数料の数 (上限は10)	10		
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	12,600		
12-11	合計の指定手数料 D	126,000		
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 R	-16,900		
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	163,900	
12-14	優先権証明書請求手数料 優先権証明書を請求した数	1		
12-15	1優先権証明書当たり (X) の手数料	1,500		
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒	1,500	
12-17	納付するべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	260,400	
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙		

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 氏名(名称)	9 6 2 1 弁理士 今村正純
13-1-2	出願人による言及 氏名(名称)	9 2 6 3 弁理士 塩澤寿夫

原本(出願用) - 印刷日時 1999年09月07日(07.09.1999) 火曜日 13時09分09秒

13-1-3	出願人による言及 氏名(名称)	9 5 8 4 弁理士 釜田淳爾
13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。確認してください。
13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
		Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 国際出願に図面が含まれていませんが、よろしいですか?
		Yellow 添付書類”別個の記名押印された委任状”が含まれていません。
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Yellow! 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。

明 細 書

ウシ白血病発症可能性の判定用抗体

技術分野

本発明は、ウシ白血病ウイルス BLV に対するウシの白血病の発症可能性を判定するために用いるモノクローナル抗体に関する。

背景技術

主要組織適合抗原(MHC)は、生体の感染防御機構において自己-非自己の識別に関与する分子であり、 α 鎖及び β 鎖からなるクラス I と α 鎖及び β 鎖からなるクラス II とからなり、それぞれの α 1と α 2ドメイン及び α 1と β 1ドメインには抗原ペプチドを噛み込む溝が存在している。そして、この溝に収容された断片化ペプチドのみがT細胞レセプターによって認識されるという特徴を有しており、クラス I を認識した CD8+細胞によって細胞死(細胞性免疫)が達成され、クラス II を認識した CD4+細胞によって主として抗体産生(液性免疫)が誘導される。

MHC は最も多型に富んだ遺伝子群であり、そのハプロタイプによってペプチド収容溝のポケットの位置、形、大きさ、及び性状が異なり、それに伴って噛み込まれる断片化ペプチドの結合状態が変化し、個体ごとの免疫応答及び疾患感受性を決定しているものと考えられている。MHC ハプロタイプと疾患抵抗性(抗病性)又は発症可能性(易病性)との相関については、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV)、及びマラリヤに関する報告がある。

ウシ MHC(BoLA) クラス II 遺伝子については、これまでに DQA, DQB, DRA, DRB, DNA, DOB, DYA, 及び DYB 遺伝子の存在が推測されている。なかでも、DRB 遺伝子座において同定されている3つの遺伝子(DRB1 ~B3)のうち、DRB3については機能的な蛋白質をコードすることが知られており、現在までに73種類の対立遺伝子の存在が明らかにされている。しかしながら、ウシの感染性疾患とウシ MHC(BoLA) ハプロタイプとの相関については従来ほとんど報告がない。

特に、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)と同様にウイルス増殖を調節する遺伝子 pX を有しており、HTLV-I に最も近縁のレトロウイルスであるウシ白血病ウイルス (BLV) については、ウシ MHC(BoLA) ハプロタイプとの相関に関して米国のグループが抗病性を中心に報告しているが、白血病発症可能性との関連性の報告は全くない。このウイルスに感染したウシの割合 (日本における感染率) は 10~20% であり、そのうちの 1~2% は 10~15 年程度という長期の潜伏期間の後に極めて悪性の地方病性ウシ白血病を発症して死に至るので、このウイルスが引き起こす畜産農家への経済的損失は非常に深刻である。ウシ MHC(BoLA) ハプロタイプの解析によって BLV 感染後のウシの発症可能性を簡単に判定できるようになれば、発症抵抗性のウシを予め選択して飼育することが可能になり、極めて安全にウシの飼育を継続することが可能になるものと期待される。

本発明者は、先に、ウシ MHC(BoLA) クラス II 遺伝子のうち、DRB 遺伝子座の構造を解析して、DRB3 遺伝子(BoLA-DRB3) 及びその遺伝子産物の構造を明らかにした (Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, pp.981-988, 1995)。本発明者はさらにこの遺伝子の機能を研究するうち、白血病発症牛と未発症牛とでは、BoLA-DRB3 の中で特に多型が認められる第二エクソンからの遺伝子産物 (β 1 ドメイン) において、明らかにアミノ酸配列の異なる部分が存在することを見いだした。また、このアミノ酸置換が、BLV に対する発症可能性及び発症抵抗性に直接関与していることを見いだした。そして、ウシ白血病ウイルス BLV に対するウシの白血病発症の可能性を判定するにあたり、ウシ個体のウシ MHC ClassII DR β 鎖の β 1 ドメインのアミノ酸番号 75 から 78 で特定されるアミノ酸配列が Val-Asp-Thr-Tyr であるウシ個体は白血病の発症可能性ありと判定することができることを見出し、該方法に係る発明を完成させた (国際公開 W098/3680)。

一方、ウシ白血病の病態の悪化に伴って BLV 感染細胞に過剰発現してくる腫瘍関連抗原に対して反応するモノクローナル抗体 (モノクローナル抗体 c143) が知られている ((a)Aida, Y. et al., Cancer Research, 52, pp.6463-6470, 1992; (b)Aida, Y. et al., Cancer Research, 53, pp.429-437, 1993)。上記刊行物 (a)(p.6469, 左欄)及び(b)(p.436, 左欄)には、上記モノクローナル抗体が認識す

る腫瘍関連抗原が MHC ClassII 抗原に関係していることが示唆されているが、このモノクローナル抗体と MHC ClassII 抗原との反応に関しては詳細には解明されておらず、また、上記モノクローナル抗体のエピトープの構造に関しては従来全く知られていない。

発明の開示

上記判定方法 (W098/3680) に行うにあたっては、ウシ個体の生体試料を採取して目的の遺伝子を増幅し、BoLA-DRB3 のエクソン 2 遺伝子の塩基配列を決定するか、PCR-RFLP 法を行う必要がある。上記刊行物には、この判定方法に有用なプライマー・セットも開示されているが、多数のウシ個体について上記の判定方法を実施することは煩雑であり、時間もかかるため、さらに簡便な判定方法の開発が求められている。

従って、本発明の課題は、ウシ個体のウシ白血病ウイルス (BLV) に対する白血病発症の可能性を簡便かつ正確に判定する手段を提供することにある。より具体的には、BoLA-DRB3 のエクソン 2 の塩基配列を決定する必要がなく、正確にウシ個体のウシ白血病ウイルスに対する白血病発症の可能性を判定する手段を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、BLV 感染細胞に過剰発現してくる腫瘍関連抗原に対して反応するモノクローナル抗体 (モノクローナル抗体 c143) が、ウシ白血病に対して発症可能性を示す MHC ClassII DR β 鎖の β 1 ドメインをコードする遺伝子を有するウシ個体を検出でき、極めて高精度に白血病発症の可能性を判定できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体 c143; ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR β 鎖の β 1 ドメインをコードする遺伝子を検出するために用いるモノクローナル抗体 c143; 並びに、ウシ白血病に対して発症可能性を示す MHC ClassII DR β 鎖の β 1 ドメインをコードする遺伝子を有するウシ個体を検出する

ために用いるモノクローナル抗体 c143 を提供するものである。

また、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR 分子に対してモノクローナル抗体 c143 と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体；ウシ白血病に対して発症可能性を示す MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR 分子に対してモノクローナル抗体 c143 と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体；並びに、ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR 分子に対してモノクローナル抗体 c143 と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体が提供される。

別の観点からは、本発明により、上記モノクローナル抗体（好ましくはモノクローナル抗体 c143）を含むウシ白血病の発症可能性の診断薬が提供される。また、モノクローナル抗体 c143 を用いてウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を検出する方法；モノクローナル抗体 c143 を用いてウシ白血病に対して発症可能性を示す MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を有するウシ個体を検出する方法；並びに、モノクローナル抗体 c143 を用いてウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ個体を検出する方法が提供される。

さらに別の観点からは、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を検出することができるモノクローナル抗体；ウシ白血病に対して発症可能性を示す MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子を有するウシ個体を検出することができるモノクローナル抗体；並びに、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ個体を検出することができるモノクローナル抗体が提供される。このモノクローナル抗体の好ましい例はモノクローナル抗体 c143 である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法の対象となるウシは特に限定されず、ウシ白血病ウイルス BLV に感染する可能性があり、感染により白血病を発症する可能性があるものであれば、乳用種、乳肉兼用種、肉用種、役用種、及び役肉兼用種などのいかなるウシを対象としてもよい。具体的には、例えば、黒毛和種、日本短角などの和牛、ホルスタイン、ジャージー、ヘレフォード、アバディーンアンガス、フリーシャン等の品種を挙げることができるが、これらの品種に限定されることはない。

本発明のモノクローナル抗体としては、好ましくはモノクローナル抗体 c143 を用いることができるが、モノクローナル抗体 c143 のほか、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR 分子に対してモノクローナル抗体 c143 と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体を用いてもよい。本明細書において用いられる「MHC ClassII DR 分子」という用語は、MHC ClassII DR α 鎖の一部又は全部と MHC ClassII DR β 鎖の一部又は全部とを含む分子を意味する。

モノクローナル抗体 c143 と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体は、本明細書の実施例に具体的に説明された方法に準じて診断を行った場合に、モノクローナル抗体 c143 と同様な判定結果を与えるか否かを判断基準として当業者に容易に選択可能である。このようなモノクローナル抗体としては、マウス、ラット、ウサギなど、適宜の哺乳類動物由来のものを使用することが可能である。なお、モノクローナル抗体 c143 (マウス、IgG2b) は文献記載の方法に従って当業者に容易に製造可能である (Aida, Y. et al., Cancer Res., 45, pp.1174-1180, 1985)。

ウシ個体のウシ MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号 75 から 78 で特定されるアミノ酸配列については、両方の対立遺伝子のアミノ酸配列(アミノ酸番号 75-78)が Val-Asp-Thr-Tyr である場合には、そのウシ個体がすでにウシ白血病ウイルス BLV に感染している場合、又はウシ白血病ウイルス BLV に感染した場合には、その個体は白血病発症の危険性が高いことが知られている (国際公開 W098/3680 ; この公報の開示を本明細書の開示として含める)。一方、対立遺伝

子におけるアミノ酸配列が Val-Asp-Thr-Tyr(VDTY) と Val-Asp-Thr-Val (VDTV) とのヘテロ ; Val-Asp-Thr-Tyr(VDTY) と Val-Asp-Arg-Val (VDRV) とのヘテロ ; Val-Asp-Thr-Val (VDTV) ホモ ; Val-Asp-Arg-Val (VDRV) ホモ : 又は、Val-Asp-Arg-Val (VDRV)と Val-Asp-Thr-Val (VDTV)ヘテロである場合などは、そのウシ個体がすでにウシ白血病ウイルス BLV に感染しているか、ウシ白血病ウイルス BLV に感染した場合であっても、白血病を発症する可能性は非常に低い。

いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明のモノクローナル抗体、好ましくはモノクローナル抗体 c143 は、ウシ MHC ClassII DR 分子に結合するが、その β 鎖のアミノ酸配列中に Val-Asp-Thr-Tyr (アミノ酸番号 75-78) を有する場合に高い反応性を有している。従って、本発明のモノクローナル抗体が高い反応性を示すウシ個体は、MHC ClassII DR β 鎖の β 1 ドメインにおいて Val-Asp-Thr-Tyr (アミノ酸番号 75-78) をコードする遺伝子 (ウシ白血病に対して発症可能性を示す遺伝子)を有しており、ウシ白血病を発症する可能性が高い。なお、ウシ MHC ClassII DR β 鎖の β 1 ドメインのアミノ酸配列については、間ら (Aida, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, pp.981-988, 1995) による報告がある。

上記のモノクローナル抗体を用いて、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR β 鎖の β 1 ドメインをコードする遺伝子を検出する方法は特に限定されず、モノクローナル抗体と抗原との結合を検出できるものであればいかなるものを用いてもよい。例えば、蛍光抗体法やフローサイトメトリー法、ELISA法、免疫組織学的検索法など、当業者に利用可能な検出法はいずれも適用可能である。検出を容易にするため、モノクローナル抗体として、蛍光物質、放射性同位元素、アビジン(又はビオチン)などで標識されたモノクローナル抗体を用いることができる。このような標識方法は当業者に周知されており、適宜の手段を採用することが可能である。

本発明の好ましい態様では、試料としてウシ個体から分離・採取したリンパ球を用いて、ウシ MHC ClassII DR 分子とモノクローナル抗体との反応性を調べることができる。例えば、ウシ個体から末梢血を抗凝固剤入りの注射筒で採取し、4℃、

3,000rpmの条件下で20分間遠心して白血球層を得た後、宮坂らの方法(Miyasaka, m. and Trnka, Z., Immunological Methods, Vol.3, pp.403-423, 1985, Academic Press, NY)により白血球から末梢血リンパ球を調製することも可能である。

末梢血リンパ球に対して本発明のモノクローナル抗体が高い反応性を示した場合には、このウシ個体は、ウシ白血病に対して発症可能性があると判定される。試料として、リンパ節や腫瘍組織などの切片を用いてもよい。通常は、対照群を用意するか、標準試料などを用いてモノクローナル抗体の反応性の程度を調べることができる。なお、PCR法によってウシMHC ClassIIDR分子をコードする遺伝子を増幅し、その遺伝子産物に対して上記モノクローナル抗体の反応性を検討することも可能である。

本発明の診断薬は、上記のモノクローナル抗体を有効成分として含み、ウシ個体についてウシ白血病の発症可能性があるか否かを判定するために用いられる。一般に、モノクローナル抗体を含む診断薬は種々の形態で調製できることが知られており、本発明の診断薬も適宜の形態の製剤として調製可能である。例えば、凍結乾燥形態の製剤、又は溶液状の形態の製剤などとして提供することができる。本発明の診断薬は、その形態に応じて、適宜の製剤用添加物の1種又は2種以上を用いて調製することが可能である。製剤用添加物としては、例えば、pH調節剤、溶解補助剤、防腐剤、緩衝剤、賦形剤などを用いることができるが、これらに限定されることはない。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

1. 材料と方法

BLVによる白血病発症に対して抵抗性あるいは感受性を示すウシMHCクラスIIDR β 鎖をコードする遺伝子を保有するウシ個体から、末梢血リンパ球を分画しmRNAを抽出した。mRNAを鋳型として、オリゴ(DT)プライマーを用いて逆転写酵素によりcDNAを合成した。さらに、得られたcDNAを鋳型として、以下の二つのプラ

イマー：

5'-TGGCTCGAGCCTCTGCTGTTCTCCGGCAT-3' 及び

5'-TGGTCTAGAACTTCAGCTCAGGAGCCCTG-3'

を用いた PCR 法により、DR β 鎖の全てのコード領域を含む cDNA クローンを単離した。用いたプライマーには XhoI と XbaI サイトが付加してある。得られた PCR 産物 (cDNA クローン) を塩基配列決定用ベクターにサブクローニングした後、塩基配列を決定して目的の遺伝子であることを確認した。

BLV による白血病に対して抵抗性を示す MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインをコードする遺伝子 (以下、「BoLA-DRB3」と呼ぶ。) の対立遺伝子として、*0902, *0701, *1101, *1401 の cDNA を、一方、感受性を示す BoLA-DRB3 対立遺伝子として、*1501, *1601, *1302, *1001 の cDNA を単離した。各 cDNA を XhoI と XbaI サイトで発現ベクター pME18Neo に挿入し、以前に単離した α 鎖の全てのコード領域を含む cDNA クローン (Aida, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 204, pp.195-202, 1994) を挿入した発現ベクターと、COS1 細胞あるいは 23CLN 細胞に一過性に共導入した。導入から約 40 時間後に、モノクローナル抗体 c143 を用いて、間接蛍光抗体法とフローサイトメトリー法を行ない、その反応性について解析した。

2. 結果

モノクローナル抗体 c143 は、BLV による白血病発症に対して感受性を示す BoLA-DRB3 遺伝子の cDNA を導入した DR 抗原発現細胞と強く反応した。なかでも、最も白血病発症牛に高頻度に認められる対立遺伝子である *1601 cDNA を導入した発現細胞に極めて強い反応性を示した。結果を下記の表 1 に示す (*モノクローナル抗体 c143 との反応性により、+ : 弱 ; ++ : 中 ; +++ : 強に分類した ; **DR β 鎖の 78 位のアミノ酸残基が V をコードする対立遺伝子を白血病発症に対して抵抗性、Y をコードする対立遺伝子を危険性と判定した ; ***BoLA-DRB3*1601 cDNA クローンは既に単離され、NR1 と命名されている (Aida, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, pp.981-988, 1995)。

表 1

α 鎖の cDNA/ β 鎖の cDNA	DRb 鎖の 78 位のアミノ酸残基が V or Y**	c143 抗体との反応性*
MR1 / BoLA-DRB3*0902	V	+
MR1 / BoLA-DRB3*0701	V	+
MR1 / BoLA-DRB3*1101	V	+
MR1 / BoLA-DRB3*1401	V	+
MR1 / BoLA-DRB3*1501	Y	++
MR1 / BoLA-DRB3*1601 (NR1)***	Y	+++
MR1 / BoLA-DRB3*1302	Y	++
MR1 / BoLA-DRB3*1001	Y	++

産業上の利用可能性

本発明のモノクローナル抗体を用いると、ウシ個体のウシ白血病ウイルス(BLV)に対する白血病発症の可能性を簡便かつ正確に判定することができる。

請 求 の 範 囲

1. ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体 c143。
2. ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR β 鎖の β 1 ドメインをコードする遺伝子を検出するために用いるモノクローナル抗体 c143。
3. ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR 分子に対してモノクローナル抗体 c143 と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体。
4. ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR β 鎖の β 1 ドメインをコードする遺伝子を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ MHC ClassII DR 分子に対してモノクローナル抗体 c143 と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体。
5. 請求の範囲第 1 項ないし第 4 項のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を含むウシ白血病の発症可能性の診断薬。
6. 請求の範囲第 1 項ないし第 4 項のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ個体を検出する方法。

要 約 書

ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体 c143; ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を検出するために用いるモノクローナル抗体であって、ウシ白血病に対して発症可能性を示すウシ MHC ClassII DR 分子に対してモノクローナル抗体 c143 と実質的に同一の反応性を有するモノクローナル抗体; 並びに、上記モノクローナル抗体を含むウシ白血病の発症可能性の診断薬。ウシ白血病に対して発症可能性を有するウシ個体を簡便かつ正確に検出することができる。